



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 338 437
A2

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 89106628.4

⑮ Int. Cl. 4: C07K 7/00 , A61K 37/02

⑭ Anmeldetag: 13.04.89

⑯ Priorität: 22.04.88 DE 3813821

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43

⑱ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑲ Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

⑳ Erfinder: Wiesmüller, Karl-Heinz
Rappenhalde 33
D-7400 Tübingen(DE)
Erfinder: Hess, Günter, Dr. Dr.
Ravensteynstrasse 75
D-4500 Koblenz(DE)
Erfinder: Jung, Günther, Prof. Dr.
Ob der Grafenhalde 5
D-7400 Tübingen(DE)

⑳ Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Kluuenseuche und Verfahren zu deren Herstellung.

⑳ Eine synthetische Vakzine gegen die Maul- und Kluuenseuche wird gebildet durch Konjugation mindestens einer Membranankerverbindung mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Kluuenseuche-Virus. Die genannte Vakzine hat den Vorteil, daß sie auch ohne Kühlung sehr lange haltbar ist und daß sie aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit bereits nach einmaliger Applikation einen ausreichenden Schutz gegen die Maul- und Kluuenseuche erzeugt.

EP 0 338 437 A2

Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche und Verfahren zu deren Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) verursacht trotz bereits lange verfügbarer Impfstoffe, in der Viehzucht große Verluste. Ein Grund für das Auftreten von Maul- und Klauenseuche in der heutigen Zeit ist die Unsicherheit von klassischen Impfstoffen, die abgetötete bzw. inaktivierte MKS-Viren enthalten: Die Inaktivierung der Viren ist mitunter nicht vollständig, so daß zu "post-vaccinalen" Ausbrüchen der MKS kommen kann (vgl. Böhm, Strohmaier, Tierärztl. Umschau 39, 3 - 8 (1984)). Diese Gefahr ist bei synthetischen MKS-Vakzinen nicht vorhanden, weil bei letzteren nur Partialsequenzen von bestimmten Virusproteinen verwendet werden, die nicht die Funktion eines intakten Virus haben.

10 Es existieren zwar bereits synthetische MKS-Vakzine (vgl. Europäische Patentanmeldung 0 204 480), die aber noch verbesserungsbedürftig sind.

Es wurde nun gefunden, daß unter Verwendung von Membranankerverbindungen und bestimmten Partialsequenzen des MKS-Virus besonders wirksame MKS-Vakzine hergestellt werden können. In der deutschen Offenlegungsschrift DE 35 46 150 A1 wird zwar als eine von vielen Anwendungsmöglichkeiten 15 von Membrananker-Wirkstoffkonjugaten die Herstellung von synthetischen Vakzinen erwähnt, es war aber nicht zu erwarten, daß die Konjugate aus Membranankerverbindungen und Partialsequenzen des MKS-Virus geringer Mengen an Vakzine aufweisen.

Weiterhin zeichnen sich die genannten Vakzine überraschenderweise dadurch aus, daß sie bereits nach 20 einmaliger Applikation einen ausreichenden Impfschutz bieten. Gegenüber herkömmlichen Vakzinen haben sie zudem den Vorteil, ohne Kühlung praktisch unbegrenzt haltbar zu sein.

Erfindungsgegenstand ist demzufolge eine synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus besteht.

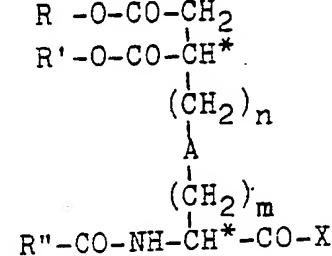
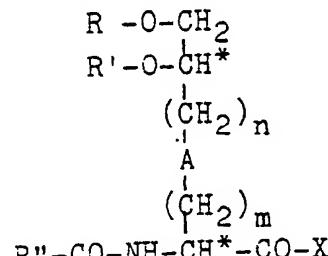
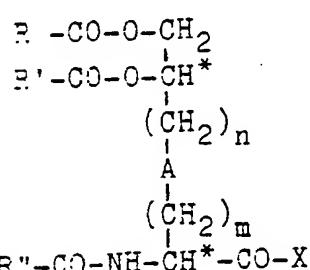
25 Membranankerverbindungen sind Verbindungen, die in biologische oder künstliche Membranen einschleusbar sind.

Weitere Erläuterungen zu den Membranankerverbindungen finden sich in der bereits zitierten deutschen Offenlegungsschrift 35 46 150 und in G. Jung et al. in "Peptides, Structure and Function", V.J. Hruby and D.H. Rich, Seiten 179 bis 182, Pierce Chem. Co. Rockford, Illinois, (1983).

30 Bevorzugte Membrananker-Wirkstoffkonjugate sind diejenigen, in denen eine Membranankerverbindung und ein Wirkstoff, d.h. eine Partialsequenz eines MKS-Virus, kovalent miteinander verknüpft sind.

Als besonders geeignet haben sich Membrananker-Wirkstoffkonjugate erwiesen, deren Membranankerverbindung ein Lipoprotein ist. Ganz besonders geeignet sind Membranankerverbindungen der folgenden Formeln.

35

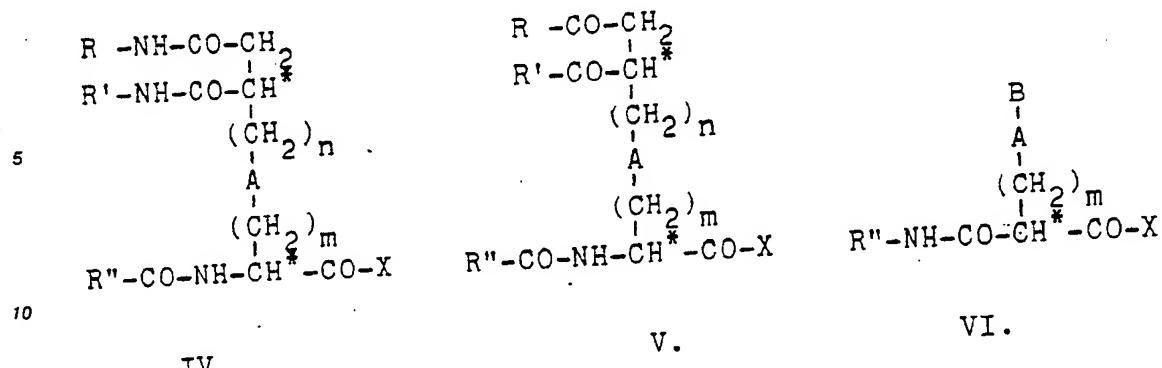


I.

II.

III.

50



VII.

in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

$a = 0$ bis 5, $m = 1$ oder 2;

30 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2,
 C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration,
 R, R' und R" gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe
 mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen
 substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten $-(CH_2)_n$ -
 35 Bedeutungen wie R, R' und R" haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, NHCOR oder -CONHR sein
 können, wobei X eine Kette von 1 bis 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden
 ist.

ist. Von diesen sind als Beispiele besonders hervorzuheben:
 In bakteriellem Lipoprotein vorkommende N-Termini, wie z.B.: Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gln, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gln-Ala-Asn-Tyr, Y-Gln-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wobei Y eine der unter Formel I bis VII aufgeführten Reste sein kann. Diese Lipopeptide können auch in verkürzter Form (Lipodi, Lipotri oder Lipotetrapeptide) als Membranankerbindung eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt ist N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-serin (Pam₃Cys-Ser-Ser), N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-glycin und N-Palmitoyl-S-[2,3-(bis-palmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-alanyl-D-isoglutamin. Beispiele weiterer bevorzugter Membrananker-
 verbindungen finden sich in der DE-OS 35 46 150.

Als Partialsequenzen des MKS-Virus, die an die Membranankerverbindung gebunden werden, eingesetzt werden. Bevorzugt sind die Partialsequenzen:

50

55

| | |
|----------------|-------------|
| Partialsequenz | - (134-154) |
| " | - (135-154) |
| " | - (134-158) |
| " | - (134-160) |
| " | - (141-160) |
| " | - (141-158) |
| " | - (200-213) |
| " | - (200-210) |
| " | - (161-180) |

15 wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können. Als beispielhafte Serotypen seien in diesem Zusammenhang angegeben:

| | | | |
|----|---------------------------|----------------------------|-----|
| 20 | Serotyp A: | 134 | 160 |
| | A ₅ Westerwald | NKYSTGGP--RRGDMGSAARAAKQLP | |
| | | 161 | 180 |
| | | ASFNYGAIRAITIHELLVRM | |
| 25 | | 200 | 213 |
| | | RHKOKIIAPARQILL | |

30

35

30

50

55

| | | | |
|----|---------------------------|---------------------------------|-----|
| 5 | A ₁₂ USA | 134 | 160 |
| | | NKYSASGSG-VRGDFGSLAPRVARQLP | |
| 10 | | 161 | 180 |
| | | ASFNYGAIKAETIHELLVRM | |
| 15 | | 200 | 212 |
| | | RHKQKIIAPGKQL | |
| 20 | | | |
| | Serotyp C: | 134 | 160 |
| 25 | C ₁ Oberbayern | TTY TAST -----RGDLAHLTAT RAGHLP | |
| 30 | | 161 | 180 |
| | | TSFNGAUKAETITGLLVAM | |
| 35 | | 200 | 213 |
| | | RHKQPLVAPAKQLL | |
| 40 | | | |
| | Serotyp O: | | |
| 45 | | 134 | 160 |
| 50 | O ₁ Kaufbeuren | CRYNRNAVPLRGDLQVLAQKVARTLP | |
| 55 | O ₁ Lausanne | CRYSRNAVPLRGDLQVLAQKVARTLP | |
| 60 | O ₂ Normandie | RRYSRNAVNRGDLQALGQKARTLP | |
| 65 | O Wuppertal | CLYSDARVSNVRGDLQVLAQKAERAL | |
| 70 | O Israel | CRYGNVAVTNVRGDLQVLAQKAERALP | |
| 75 | | 200 | 213 |
| 80 | O ₁ Kaufbeuren | RHKQKIVAPVKQTL | |
| 85 | O ₁ Kaufbeuren | 161 | 180 |
| | | TSFNYGAIKATRVTELLYRM | |

Besonders geeignet sind synthetische Vakzine, die aus einer Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Klauenseuche-Virus bestehen, die jeweils kovalent an die Membranankerverbindung(en) gebunden sind.

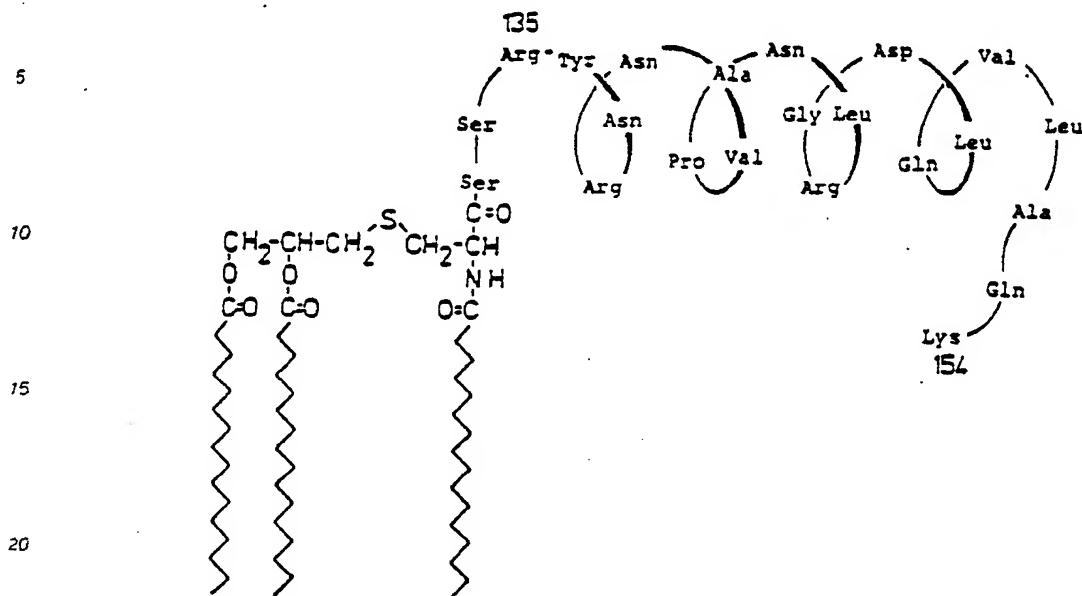
Besonders bevorzugt sind synthetische Vakzine, die aus einer Mischung von Sequenzen VPI 134-160 der Serotypen O, A, C, gebunden an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin, bestehen.

Bei Verwendung der Sequenz 134-154 vom Serotyp O und der Sequenz 134-155 vom Serotyp A kann dieselbe, soweit sie C-terminales Lysin enthält, über die ϵ -Aminogruppe mit der Membranankerverbindung kovalent verknüpft werden.

Als besonders geeignet haben sich erfundungsgemäße synthetische Vakzine erwiesen, die die Partialsequenz des MKS-Virus VP 1(135-154) enthalten.

Besonders bevorzugt ist weiterhin eine Vakzine bestehend aus N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-

propyl]-cysteinyl-seryl -seryl-VP 1 (135-154), d.h. die Verbindung der nachstehenden Formel.



Die Membranankerverbindungen können grundsätzlich als R,S-, R,R-Diastereomere oder als Diastereomerengemisch vorliegen. Es hat sich allerdings gezeigt, daß die Vakzinen, die eine R,R-diastereomere Membranankerverbindung enthalten, eine besonders hohe Wirksamkeit zeigen.

Erfindungsgegenstand ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Partialsequenzen des MKS-Virus durch eine Konjugationsreaktion an die Membranankerverbindung gebunden wird. Die Konjugationsreaktion kann z.B. eine Kondensation, Addition, Substitution, Oxidation oder Disulfidbildung sein. Bevorzugte Konjugationsmethoden sind in Beispiel 1 wiedergegeben. Weitere Konjugationsmethoden sind in der bereits zitierten deutschen Offenlegungsschrift 35 46 150 beschrieben.

Die Herstellung der Membranankerverbindungen ist ebenfalls in der zuletzt genannten deutschen Offenlegungsschrift ausführlich beschrieben.

Die gegebenenfalls nötige Trennung der Diastereomeren kann nach unterschiedlichen Methoden, wie z.B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 364 (1983) 593 beschrieben erfolgen. In Beispiel 2 ist ein bevorzugtes Trennverfahren beschrieben.

Der Aufbau der Partialsequenzen der jeweiligen MKS-Proteine kann auf unterschiedliche, literaturbekannte Weise erfolgen, vgl. z.B. Wünsch et al. in Houben-Weyl, Bd. 15/1.2, Stuttgart, Thieme-Verlag oder Wünsch in Angew. Chem. 83 (1971), 773, E. Gross und J. Meienhofer (Herausgeb.), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981) und 5 (1983) Academic Press, New York oder die deutsche Offenlegungsschrift 35 46 150. In Beispiel 3 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung einer Partialsequenz und eines Konjugats näher erläutert.

Weiterhin gehören zum Erfindungsgegenstand pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitungen, die einen Gehalt an Konjugat aus Membranankerverbindung und Partialsequenz eines MKS-Virus aufweisen. Normalerweise werden zusätzlich neben einem Lösungsmittel keine zusätzlichen Hilfs- und Trägerstoffe oder Adjuvanzien für die erfindungsgemäßen Zubereitungen benötigt. In manchen Fällen kann es aber sinnvoll sein, derartige Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie gegebenenfalls Adjuvanzien den erfindungsgemäßen Zubereitungen zuzusetzen. Das Mischen und Abfüllen der betreffenden Stoffe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren.

Die Menge an Vakzine, die für eine sichere Immunisierung eines Tieres notwendig ist, hängt ab von der Tierart, der bzw. den Membranankerverbindungen und der bzw. den Partialsequenzen des MKS-Virus und ist im Einzelfall empirisch zu ermitteln. Für die sichere Immunisierung eines Meerschweinchens gegen den MKS-Virus-Serotyp 0,1 genügt z.B. eine einmalige Verabreichung von ca. 100 - 500 µg von erfindungsgemäßer Vakzine, ohne weitere Hilfs- oder Trägerstoffe.

Weiterhin gehört zum Erfindungsgegenstand die Verwendung der beschriebenen Vakzine zur Erzeugung von Antikörpern in Säugetieren.

Beispiel 1**Konjugation von Peptiden/Proteinen mit Pam₃Cys-Ser-Ser-OSu bzw. Pam₃Cys-Ser-Ser-OH**

5

1. Peptide und Proteine löslich in DMF

2 μ Mol Peptid/Protein werden in 0,5 - 1 ml DMF gelöst und 8 μ Mol (9,2 mg) festes Pam₃Cys-Ser-Ser-OSu zugegeben. Durch leichtes Erwärmen und beschallen wird eine homogene Lösung erhalten und es werden 4 μ Mol organische Base (N-Ethylmorpholin) zugegeben. Nach 12 h Rühren werden 1 - 2 ml Chloroform: Methanol (1:1) zugegeben und es wird 2 h im Eisbad gekühlt. Das Sediment wird mit 1 ml kaltem Chloroform: Methanol (1:1) gewaschen in tert. Butanol/Wasser (3:1) aufgenommen (evtl. beschallen) und lyophilisiert.

15

2. Peptide und Proteine löslich in Wasser

2 μ Mol Peptid/Protein werden in 0,8 ml Wasser gelöst und mit 4 μ Mol (4,5 mg) Pam₃Cys-Ser-Ser-OH versetzt. Es wird gründlich beschallt bis eine Emulsion entsteht und ein pH-Wert von 5,0 bis 5,5 eingestellt. Nach Zugabe von 5 mg EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid), gelöst in 100 μ l H₂O, wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zweimal gegen je 1 l dest. H₂O dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wird lyophilisiert.

25

Beispiel 2**Trennung der Diastereomeren von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bis-palmitoyloxy)propyl]-cystein-tert.-butylester (Pam₃Cys-OBu^t):**

2 g Pam₃Cys-OBu^t werden in 10 ml Laufmittel, Dichlormethan/Essigester (20:1), gelöst und auf eine Säule (Länge 120 cm, Durchmesser 4 cm) gefüllt mit MN-Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm/70 - 230 mesh ASTM, aufgetragen. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 2 Tr./sec werden 350 Fraktionen a 10 ml gesammelt und ein Aliquot jeder Fraktion nach Chromatographie auf Kieselgel 60-Platten in Dichlormethan/Essigester (20:1) und Anfärbung mit Chlor/TDM Reagenz auf Pam₃Cys-OBu^t geprüft. Fraktionen 280 - 315 enthalten das R,R-Diastereomere, Fraktionen 316 - 335 eine Mischung aus R,R und R,S und Fraktionen 336 - 354 das R,S Diastereomere von Pam₃Cys-OBu^t. Nach Abdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, Aufnehmen des Rückstandes in warmem tert.-Butanol und Lyophilisieren erhält man 600 mg R,R-, 370 mg Mischung aus R,R- und R,S- und 540 mg R,S-Pam₃Cys-OBu^t.

Beispiel 3**45 Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bis-palmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-seryl-VP 1 (135-154)**

Die VP 1 Peptidsequenz des MKS-Virus Serotyp 0,K wurde durch Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert. Es wurden Fmoc Aminosäuren benutzt. Folgende Seitenketten-Schutzgruppen kamen zur Anwendung: 50 Lys(Boc), His(Fmoc), Arg(Mtr), Ser(tBu), Asp(OtBu), Tyr(tBu). Ausgehend von 1 g p-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, beladen mit Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,47 mmol/g) wurden folgende Syntheszyklen durchlaufen:

N-Aktivierung mit 55 % Pipéridin in N-Methylpyrrolidon (1 x 2 Min, 1 x 5 Min), Präaktivierung von 55 Fmoc-A-A-OH (1,5 mmol) in N-Methylpyrrolidon (6 ml) mit Diisopropylcarbodiimid (1,5 mmol) und 1-Hydroxybenzotriazol (1,5 mmol) mit anschließender Kupplung für 1,5 Std. Nach Waschen mit N-Ethylmorpholin (5 % in N-Methylpyrrolidon) wurden Präaktivierung und Kupplung wiederholt. Die Blockierung von nicht umgesetzten Aminogruppen wurde mit Acetanhydrid (2,5 mmol) und Diisopropylamin (1,2 mmol) in N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde das Peptid-Harz mehrfach mit N-Methylpyrrolidon

don. Dichlormethan und erneut mit N-Methylpyrrolidon gewaschen.

Nach der Synthese der harzgebundenen MKS-Virus-Sequenz wurde ein Teil des Peptids durch Trifluoressigsäurespaltung gewonnen und überprüft mittels HPLC, MS, Aminosäurenanalyse, Analyse auf chiraler Phase sowie Sequenzanalyse. Nachdem 2 Serinreste an das harzgebundene Peptid gebunden wurden, erfolgte die Kupplung des Tripalmitoyl-S-glycerylcysteins. Nach 4 Stunden wurde 1 Äquivalent N-Methylmorpholin hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde wurde das Lipopeptid-Harz gewaschen. Das Lipopeptid wurde vom Harz mittels 2 ml Trifluoressigsäure (mit 100 µl Thioanisol) innerhalb von 4 1/2 Stunden getrennt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit Essigsäure aufgenommen und in kalten Ether gegeben. Das ausgefallene Lipopeptid wurde 3 x mit Ether gewaschen. Weitere Reinigung wurde erzielt durch Umkristallisation aus Trifluoroethanol/Chloroform im Verhältnis 1:3 mit kaltem Aceton und einigen Tropfen Wasser. Das Lipopeptid wurde aus tert.-Butanol/Wasser im Verhältnis 3:1 lyophilisiert.

Beispiel 4

15

Wirksamkeitstest:

Zufällig ausgewählte Meerschweinchen mit einem Gewicht von 450 bis 500 g wurden intramuskulär oder subkutan geimpft. 0,5 mg der lyophilisierten Vakzine (N-Palmitoyl-S-[(2R,R)-2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-seryl-VPI(135-154) wurden emulsifiziert in 500 µl einer 1:1-Mischung aus 0,05 M Phosphatpuffer und Intralipid^(R) (Kabi Vitrum, Schweden). Die Mischung wurde für 10 s beschallt. Vier Tiere wurden mit dem MKS-Virus infiziert, indem ihnen in die linke Hinterpfote mindestens 500 Meerschweinchen-Einheiten eines virulenten O₁K FMD-Virus 21 Tage nach der Impfung subkutan injiziert wurden. Als Kontrollen wurden Tiere herangezogen, denen an Stelle des Impfstoffs die Membranankerverbindung, bzw. Phosphatpuffer injiziert worden war. Bei allen geimpften Tieren wurde ein hoher Titer neutralisierender Antikörper log₂SN₅₀ von 0,36 gefunden. Die Kontroll-Tiere hatten keinen Antikörper-Titer (Blindwert 0,17). Der Titer der neutralisierenden Antikörper wurde bestimmt als Logarithmus der Serum-Verdünnung, die notwendig war, um 50 % der Viruszellen in einer einlagigen Schicht von BHK-(Baby Hamster Kidney)-Zellen zu neutralisieren. Bei den geimpften Tieren konnten mittels Anti-Peptid ELISA-Assays (A₄₉₂) Antikörper nachgewiesen werden, was bei den nicht geimpften Tieren nicht möglich war. Geimpfte Tiere zeigten keine Sekundärläsionen, während alle nicht geimpften Tiere das Vollbild der Maul- und Klauenseuche-Infektion zeigten.

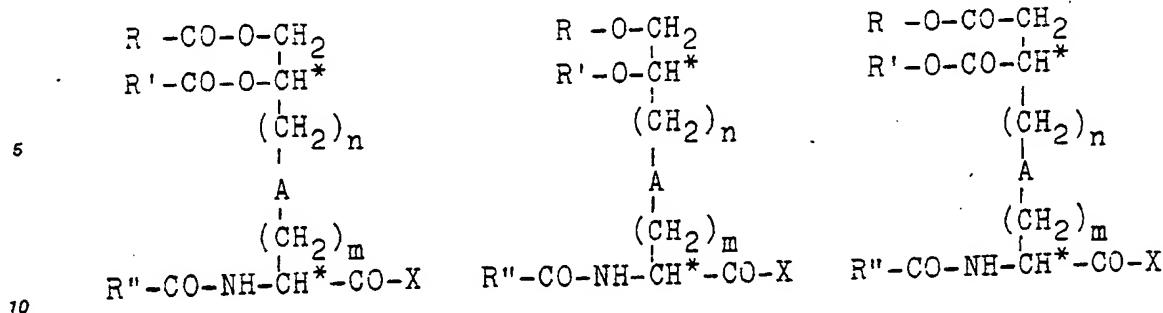
35

Ansprüche

1. Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus besteht.
2. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Membranankerverbindung und einer Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die kovalent miteinander verknüpft sind, besteht.
3. Synthetische Vakzine gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.
4. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist

50

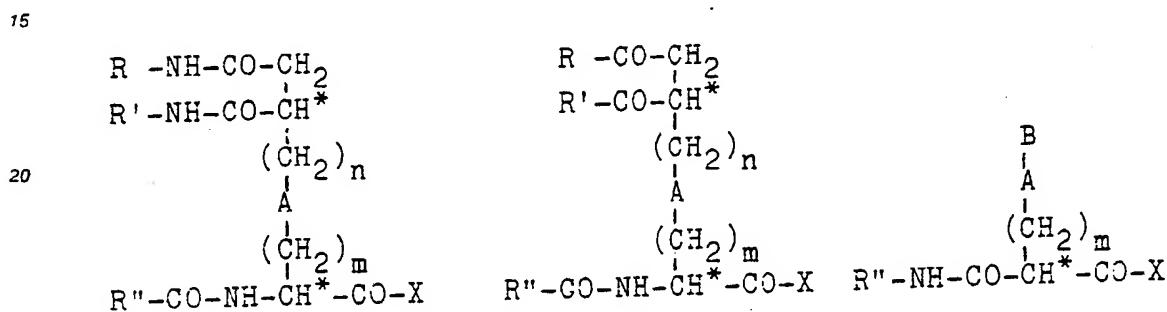
55



I.

II.

III.



IV.

V.

VI.



VII.

in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

45 C ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration, R, R' und R" gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n- (substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben 50 Bedeutungen wie R, R' und R" haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden ist.

5. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die an die Membranankerverbindung gebunden ist, 55 ausgewählt ist aus der Gruppe

Sequenz- (134-154)

- " - (135-154)
- " - (134-158)
- " - (134-160)
- " - (141-160)
- " - (141-158)
- " - (200-213)
- " - (200-210)
- " - (161-180),

5

10

15

oder deren C-terminal amidierte oder alkylamidierte Formen, wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können.

6. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Kluenseuche-Virus VP 1 (135-154) an die Membranankerverbindung gebunden ist.

7. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Kluenseuche-Virus besteht, die jeweils kovalent an die Membranankerverbindung oder Membranankerverbindungen gebunden sind.

25 8. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von Sequenzen VP1 134 - 160 der Serotypen O, A oder C gebunden an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin besteht.

30 9. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine aus N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-seryl VP 1 (135-154) besteht, wobei die Membranankerverbindung als R,S-, R,R-Diastereomeres oder als Diastereomerengemisch vorliegen kann.

10. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung als R,R-Diastereomeres vorliegt.

35 11. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, daß die in an sich bekannter Weise hergestellten Partialsequenzen des Maul- und Kluenseuche-Virus durch eine Konjugationsreaktion an die Membranankerverbindung gebunden werden.

40 12. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 11 gegebenenfalls neben üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen, Adjuvantien und/oder weiteren Vakzinen.

13. Verwendung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 12 zur Erzeugung von Antikörpern gegen Maul- und Kluenseuche-Viren in Säugetieren.

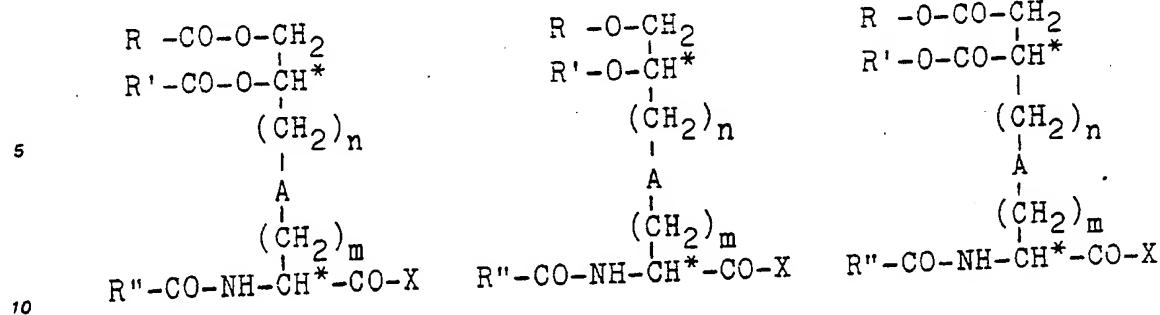
45 14. Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gegen die Maul- und Kluenseuche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Membranankerverbindung durch eine Konjugationsreaktion mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Kluenseuche-Virus verbunden wird.

50 2. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membranankerverbindung und eine Partialsequenz des Maul- und Kluenseuche-Virus kovalent miteinander verknüpft werden.

3. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.

55 4. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist

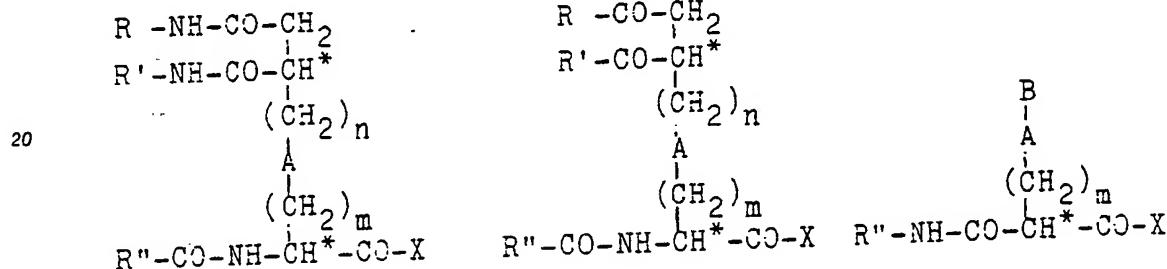


I.

II.

III.

15

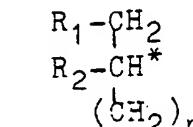


IV.

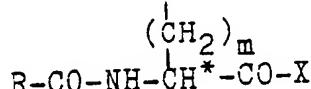
V.

VI.

30



35



40

VII.

in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

45 C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration,
 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n- (substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden ist.

50 5. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die an die Membranankerbindung gebunden ist, ausgewählt ist aus der Gruppe

Sequenz-(134-154)

- " -(135-154)
- " -(134-158)
- " -(134-160)
- " -(141-160)
- " -(141-158)
- " -(200-213)
- " -(200-210)
- " -(161-180),

5

10

15

oder deren C-terminal amidierte oder alkylamidierte Formen, wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können.

6. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Kluenseuche-Virus VP 1 (135-154) an 20 die Membranankerverbindung gebunden ist.

7. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Kluenseuche-Virus jeweils kovalent an die Membranankerverbindung oder Membrananker- 25 verbindungen gebunden wird.

8. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Sequenzen VP1 134 - 160 der Serotypen O, A oder C an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-s-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin gebunden wird.

9. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin VP 1 (135-154) gebildet wird, wobei die Membranankerverbindung als R,S-, R,R-Diastereomeres oder als Diastereomerengemisch vorliegen kann.

10. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung als R,R-Diastereomeres vorliegt.

11. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen oder veterinärmedizinischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß eine synthetische Vakzine hergestellt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 10 mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen, Adjuvantien und/oder weiteren Vakzinen in an sich bekannter Weise in eine zur Verabreichung geeignete Form gebracht wird.

12. Verwendung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 10 zur 40 Erzeugung von Antikörpern gegen Maul- und Kluenseuche-Viren in Säugetieren.

-5

50

55



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 338 437 A3

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 89106628.4

⑮ Int. Cl. 5. C07K 7/00, A61K 37/02

⑭ Anmeldetag: 13.04.89

⑯ Priorität: 22.04.88 DE 3813821

⑰ Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43

⑱ Erfinder: Wiesmüller, Karl-Heinz
Rappenhalde 33
W-7400 Tübingen(DE)
Erfinder: Hess, Günter, Dr. Dr.
Ravensteynstrasse 75
W-4500 Koblenz(DE)
Erfinder: Jung, Günther, Prof. Dr.
Ob der Grafenhalde 5
W-7400 Tübingen(DE)

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 08.05.91 Patentblatt 91/19

⑯ Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche und Verfahren zu deren Herstellung.

⑯ Eine synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche wird gebildet durch Konjugation mindestens einer Membranankerverbindung mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus. Die genannte Vakzine hat den Vorteil, daß sie auch ohne Kühlung sehr lange haltbar ist und daß sie aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit bereits nach einmaliger Applikation einen ausreichenden Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche erzeugt.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 6628

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|--|--|--|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betriftt Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4) |
| Y,D | EP-A-0 210 412 (HOECHST) * Seite 3, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 7; Seite 7, Zeile 31 - Seite 8, Zeile 23; Seite 44, Zeile 30 - Seite 45, Zeile 14; Ansprüche 4,19 * | 1-8, 11-12 | C 07 K 7/00 A 61 K 37/02 |
| Y | PEPTIDES - PROCEEDINGS OF THE 10th AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, St. Louis, 23.-28. Mai 1987, Seiten 553-554, ESCOM, Leiden, NL; A.YU. SUROVOY et al.: "Mimicking protective epitopes of foot and mouth disease virus with synthetic peptides" * Insgesamt * | 1-8, 11-12 | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4) |
| | -- | ./. | C 07 K A 61 K |
| UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE | | | |
| <p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: 13 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)</p> | | | |
| Recherchenort | Abschlußdatum der Recherche | Prüfer | |
| DEN HAAG | 25-01-1991 | KORSNER | |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze | | E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 6628

-2-

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4) |
|------------------------|---|---|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | |
| Y | <p>EXPERIENTIA, Band 42, 1986, Seiten 521-531, Birkhäuser Verlag, Basel, CH; G.H. WERNER et al.: "Immunomodulating peptides"</p> <p>* Seite 522, (Lipopeptides)- Seite 524, Spalte 1 *</p> | 1-8, 11-12 |
| A | <p>SYMPORIUM ON SYNTHETIC PEPTIDES AS ANTIGENS, London, 4.-6. Juni 1985, Seiten 184-199, Wiley & Sons, Chichester, GB; M. SELA et al.: "Synthetic peptides with antigenic specificity for bacterial toxins"</p> <p>* Seite 184 (Zusammenfassung); Seiten 186-187 (Synthetische Vakzine); Seite 192, Spalte 1 und Figur 4; Seite 197, Spalte 2 - Seite 198, Spalte 1 *</p> | 1 |
| A | <p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Band 82, Januar 1985, Seiten 178-182, Washington, US; H.M. GEYSEN et al.: "Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein"</p> <p>* Seite 179, Figur 1 *</p> | 1-12 |
| X,P | <p>VACCINE, Band 7, Februar 1989, Seiten 29-33, Butterworth & Co. Ltd, Guildford, GB; K.-H. WIESMÜLLER et al.: "Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator"</p> <p>* Insgesamt * -----</p> | 1-12 |